بهینه سازی پارامترهای مؤثر بر فرآیند تولید داربست مهندسی بافت نانوبیوکامپوزیتی پلی لاکتیک گلیکولیک اسید/ کیتوزان*

صدیقه واعظی فر[۱] الهام حلوانی انارکی[۲]

چکیده

علم بین رشته‌ای مهندسی بافت، سلول‌های ناحیه‌ای از بدن یا سلول‌های بنیادی در محیط خارج بدن را کشت داده، مجتمع سلولی رشد و تمایزیافته را بر روی بسترهای بیومتریالی نشانده و وارد بدن فرد بیمار می‌کنند. پلی‌لاکتیک‌گلیکولیک‌اسید و کیتوزان به‌ترتیب از دسته‌ی پلیمرهای مصنوعی و طبیعی متداول برای کاربردهای مهندسی بافت هستند. در این پژوهش با استفاده از روش الکتروریسی/الکترواسپری همزمان، داربست مهندسی بافت نانوبیوکامپوزیتی تهیه شد. در این تحقیق الیافی با آرایش تصادفی و هم‌راستا تهیه شد و مورفولوژی و میانگین اندازه ذرات و میانگین قطر الیاف به روش آنالیز با نرم افزار مورد ارزیابی قرار گرفت.

واژه‌های کلیدی الکترواسپری، الکتروریسی، پلی لاکتیک گلیکولیک اسید، داربست، نانوذرات کیتوزان، مهندسی بافت.

Optimization of Process Parameters of PLGA/CS Nano-bio-camposite as Tissue Engineering Scaffold

S. Vaezifar E. Halvani-Anaraki

Abstract

Tissue engineering, as an interdisciplinary science, is culturing cell body or stem cells outside the body and depositing grown and differentiated cell complex on substrate biomaterials into a patient's body. PLGA and chitosan are commonly used for tissue engineering applications, respectively as synthetic and natural polymers. In this study, nano-biocomposite scaffold of tissue engineering was prepared by electrospinning/electrospraying method. Nanofibers with random and aligned arrangement were prepared. The average particle size and fiber diameter was measured using Image J analysis software.

Keywords Electrospraying; Electrospinning; PLGA; Scaffold; Chitosan Nanoparticles; Tissue Engineering.

---

* نسخهٔ نخست مقاله در تاریخ ۹٤/۱۰/۱٤ و نسخهٔ پایانی آن در تاریخ ۹۵/۱۰/۲۰ به دفتر نشریه رسیده است.

(۱) نویسنده مسئول: استادیار مهندسی پزشکی، گروه بیومتریال، دانشکده فنی مهندسی، دانشگاه پیام نور، مرکز اصفهان. ایران.

Email: s.vaezifar@pnu.ac.ir

(۲) دانشجوی دکتری نانومواد، دانشکده مهندسی مواد، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان.

DOI: 10.22067/ma.v0i29.52754

مقدمه

در سال‌های اخیر با گسترش علم بین رشته‌ای مهندسی بافت که تلفیقی از به‌کارگیری روش‌های سلولی، مهندسی و علم مواد در ساخت بافت‌های زنده است، روزنه‌ی امیدی برای درمان و ترمیم ضایعات بافتی و نقص عضو پدید آمده است. با استفاده از این فناوری، سلول‌های ناحیه‌ای از بدن یا سلول‌های بنیادی را در محیط خارج بدن کشت داده و سپس مجتمع سلولی رشد کرده و یا تمایزیافته را وارد بدن فرد بیمار می‌کنند. در بیشتر مواقع، تکثیر و تمایز سلول‌ها بر روی بسترهایی صورت می‌گیرد که تقلیدی از ماتریکس خارج سلولی سلول‌های حیوانی است. این بسترهای مهندسی بافت از جنس پلیمرهای مصنوعی و طبیعی می‌باشند. پلی‌لاکتیک‌گلیکولیک‌اسید و کیتوزان به‌ترتیب از دسته‌ی پلیمرهای مصنوعی و طبیعی متداول برای کاربردهای مهندسی بافت هستند. در داخل بدن، بافت‌ها یک ساختار سه بعدی دارند. در مهندسی بافت، برای اینکه داربست تولیدشده به‌طور موفقیت‌آمیزی برای تولید مجدد بافت به‌کار رود، باید یک ساختار سه بعدی داشته باشد که سلول‌ها به‌راحتی بر روی آن توزیع شوند. فناوری‌های مختلفی برای ساخت داربست‌های سلولی به‌کار می‌رود که از آن جمله می‌توان به روش‌های جداسازی فاز، حل‌سازی ذره‌ای، ریختگی حلال، خشک‌کردن انجمادی و الکتروریسی اشاره کرد [1]. الکتروریسی، روش ریسندگی الیاف است که وابسته به نیروهای الکتروستاتیکی بوده و برای تولید الیاف با قطرهایی در محدوده‌ی نانو و میکرومتر استفاده می‌شود. این روش به‌عنوان یک روش ساده، پیشرفت‌های زیادی را در زمینه‌ی تولید الیاف از محلول‌های پلیمری یا مذاب داشته است. اصول کار به این صورت است که با قراردادن یک الکترود در محلول پلیمری و الکترود دیگر در صفحه‌ی جمع‌کننده یا متصل‌کردن آن به زمین، یک پتانسیل الکتریکی بین قطره پلیمری یا مذاب تشکیل شده در نوک سوزن و صفحه‌ی جمع‌کننده الیاف اعمال می‌شود.

علاوه بر تولید نانوالیاف با استفاده از این دستگاه می توان به روش الکترواسپری، نانوذرات را تولید کرد. تشکیل نانوذرات و یکنواختی اندازه ذرات ایجاد شده با استفاده از روش الکترواسپری وابستگی بالایی به کنترل پارامترهای موثر بر فرآیند دارد.

با توجه به مطالعات صورت‌گرفته و با در نظرگرفتن خواص مناسب داربست PLGA/CS، اخیرا ساخت این داربست به روش‌های مختلف و استفاده از آن در مهندسی بافت مورد توجه قرار گرفته است [2-5]. لذا در مطالعه‌ی حاضر از ترکیب این دو پلیمر طبیعی و مصنوعی جهت ساخت داربست استفاده شد. در بخشی از این پروژه عظیم، تهیه داربست در دو حالت سرنگ‌های عمود برهم و سرنگ‌های هم راستا مورد ارزیابی قرار گرفت که دستاوردهای آن در این مقاله آورده شده است.

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده. مشخصات مواد مورد استفاده در تهیه‌ی داربست‌های مختلف در جدول (۱) آمده است.

جدول ۱ نام و شرکت سازنده مواد مورد استفاده در تهیه‌ی داربست‌ها

نام ماده	شرکت سازنده
کیتوزان	سیگما–آلدریچ
پلی‌لاکتیک‌گلیکولیک‌اسید	سیگما–آلدریچ
تری‌فلوروواتانول	مرک
تری‌فلوروواستیک‌اسید	مرک
اسید استیک	مرک
اتانول	مرک

تهیه‌ی نانوذرات کیتوزان به روش الکترواسپری

تهیه‌ی نانوذرات کیتوزان با استفاده از دو حلال اسیداستیک و تری‌فلوروواستیک‌اسید با غلظت‌های مختلف به روش الکترواسپری صورت گرفت. جهت به‌دست آوردن شرایط بهینه، پارامترهایی نظیر غلظت محلول، ولتاژ، نرخ جریان محلول و فاصله سر سرنگ تا

صفحه‌ی جمع‌کننده بررسی شد. محلول‌های کیتوزان با غلظت ۰/۵ و ۱/۰ درصد وزنی-حجمی در اسیداستیک (۹۰٪ حجمی-حجمی) و با غلظت ۱/۰، ۲/۰ و ۳/۰ درصد وزنی-حجمی در تری‌فلورواستیک‌اسیدتهیه شد. این غلظت‌ها با حل‌کردن مقدار مناسب از پودر پلیمری کیتوزان در حلال‌های ذکر شده در ظرف دربسته تهیه شدند. جهت حصول اطمینان از یکنواختی محلول‌های تهیه شده، هم‌زدن به کمک همزن مغناطیسی در دمای اتاق به‌مدت ٤ ساعت ادامه یافت. در این بخش محلولهای با دو حلال مختلف اسید استیک و تری‌فلورواستیک‌اسید با غلظت های مختلف الکترواسپری شد. قبل از بررسی پارامترها به منظور انتخاب شرایط بهینه، نحوه قرارگیری سرنگ الکترواسپری در دو حالت عمود بر میز کار و هم راستا با میز کار مورد ارزیابی قرار گرفت.

تهیه نانوالیاف PLGA به روش الکتروریسی

محلول‌های الکتروریسی با حل‌کردن مقدار مورد نیاز گرانول پلی‌لاکتیک‌گلایکولیک‌اسید در حلال خالص تری‌فلوروواتانول در ظرف دربسته تهیه‌شدند. جهت حصول اطمینان از یکنواختی محلول‌های الکتروریسی، هم‌زدن به کمک همزن مغناطیسی در دمای اتاق به‌مدت ۲۰ ساعت ادامه یافت.

قابلیت الکتروریسی و شرایط بهینه‌ی تولید نانوالیاف، با آزمودن محلول‌هایی با غلظت متفاوت در محدوده‌های متفاوتی از ولتاژ، نرخ پمپاژ (نرخ تغذیه محلول) و در صورت نیاز فاصله سر سرنگ تا صفحه‌ی جمع‌کننده بررسی و تعیین شد.

جهت به‌دست آوردن شرایط بهینه به‌منظور رسیدن به حداقل میانگین قطر الیاف، پارامترهای مختلف نظیر غلظت، نرخ تغذیه، اختلاف پتانسیل و فاصله تا صفحه جمع کننده تغییر داده شد. در هر یک از شرایط مذکور فرایند الکتروریسی با جمع‌آوری الیاف برروی درام پوشیده شده با فویل آلومینیوم با سرعت چرخش پایین (۵۰ دور بر دقیقه) جهت به دست آوردن الیاف با آرایش نامنظم و با جمع آوری بر روی درام با سرعت چرخش بالا (٤۰۰۰ دور بر دقیقه) به منظور دستیابی به الیاف با آرایش موازی انجام شد. شرایط بهینه جهت تهیه نانوالیاف به دست آمد.

تهیه نانوبیوکامپوزیت به روش الکتروریسی و الکترواسپری همزمان در دو حالت سرنگ‌های عمود برهم و سرنگ‌های هم راستا

به‌منظور تهیه‌ی داربست نانوبیوکامپوزیت PLGA/CS، از الکترواسپری محلول کیتوزان بر روی وب نانوالیاف در حال الکتروریسی محلول PLGA به‌طور همزمان از دو سرنگ در دو حالت استفاده شد. در حالت اول موقعیت قرارگیری دو سرنگ نسبت به هم عمود بوده (شکل (۱-الف)) و در حالت دوم دو سرنگ در موقعیت موازی و هم راستا با یکدیگر قرار گرفت (شکل (۱-ب)).

همانطور که در بخش تهیه‌ی نانوذرات کیتوزان به روش الکترواسپری گفته شد به دلیل تاثیر جاذبه زمین بر روی میزان کشش قطرات و ذرات ریز محلول در حالت سرنگ‌های عمود برهم، عدم یکنواختی در تشکیل ذرات را خواهیم داشت و ذرات به صورت غیر قابل کنترل و به شکل کلوخه بر روی بستر جمع آوری می‌شوند. بنابراین حالت سرنگ‌های هم راستا مطلبق با شکل (۱-ب) انتخاب شد. در شرایط بهینه، محلول ۲٪ وزنی-حجمی از کیتوزان در حلال تری فلورواستیک اسید تهیه شد. این محلول درون یکی از سرنگ‌ها پر شد و بر روی یکی از پمپ‌های تزریق سوار شد. همچنین محلول تهیه‌شده‌ی ۲٤٪ وزنی- حجمی از PLGA در حلال تری فلوروواتانول نیز درون سرنگ دیگر پر شد و بر روی پمپ تزریق هم راستا سوار شد. با اعمال شرایط بهینه نانوبیوکامپوزیت PLGA/CS با موفقیت تهیه شد. لازم به‌ذکر است که کنترل پارامترهای محیطی نظیر نحوه قرارگیری سرنگ‌های تزریق نسبت به یکدیگر، جاذبه زمین بر روی قطرات پلیمری، دمای محیط و جریان

جوی در اطراف سیستم، در دستیابی به وب نانوبیوکامپوزیت کاملا یکنواخت بسیار حائز اهمیت است. وب نانوبیوکامپوزیت PLGA/CS با استفاده از این روش در سه نسبت ۹۰/۱۰، ۸۰/۲۰ و ۷۰/۳۰ تهیه‌شد.



(الف)



(ب)

شکل ۱ الف) سرنگ‌های تزریق عمود برهم و ب) سرنگ‌های تزریق هم راستا

بررسی مورفولوژی و تعیین میانگین قطر نانوذرات و نانوالیاف در داربست‌های تهیه شده

داربست‌های نانوبیوکامپوزیتی در همه نسبت‌های ذکرشده با آرایش الیاف تصادفی و الیاف موازی تهیه شد. مشاهده مورفولوژی الیاف توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی صورت گرفت. جهت تعیین میانگین قطر نانوالیاف و نانوذرات در دابست‌ها از روش آنالیز تصاویر با نرم افزار Image J استفاده شد.

یافته ها و بحث

یک داربست ایده‌آل برای ترمیم بافت، بایستی خصوصیات حیاتی و مهمی مانند زیست‌تخریب‌پذیری با سرعت کنترل‌شده و زیست‌سازگاری داشته باشد. همچنین روش تولید داربست بایستی خواص مکانیکی-فیزیکی لازم را برای داربست تأمین کند، ضمن این‌که آسان و اقتصادی باشد [4,7,8]. بنابراین روش تولید و طراحی داربست از عوامل اساسی برای بهبود عملکرد بافت ترمیم شده است. از آنجا که خصوصیات سطح داربست مورد استفاده در مهندسی بافت نقش به‌سزایی در چسبندگی، رشد و تکثیر سلول‌ها و ایجاد ماده‌ی زمینه برون‌سلولی دارد، موفولوژی داربست ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

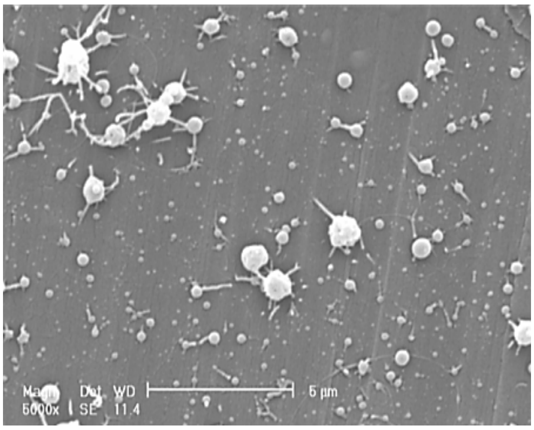
ارزیابی تأثیر نحوه قرارگیری سرنگ الکترواسپری بر روی مورفولوژی و اندازه ذرات نانوکیتوزان

نتایج حاصل از الکترواسپری با سرنگ عمود بر میز کار نشان داد به دلیل تاثیر جاذبه زمین بر روی میزان کشش قطرات و ذرات ریز محلول در این حالت عدم یکنواختی در تشکیل ذرات را خواهیم داشت و ذرات به صورت غیر قابل کنترل و به شکل کلوخه بر روی بستر جمع آوری می شوند. بنابراین حالت هم راستا با میز کار برای سرنگ الکترواسپری محلول کیتوزان انتخاب شد و الکترواسپری محلول های کیتوزان با دو حلال اسیداستیک و تری‌فلوروواستیک‌اسید و غلظت های مختلف این محلول ها جهت تهیه نانوذرات کیتوزان صورت گرفت و پارامترهای متغیر فرآیند الکترواسپری محلول کیتوزان و تهیه نانوذرات کیتوزان در حالت بهینه به دست آمد. شکل (۲) الف و ب تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی محلول کیتوزان الکترواسپری شده در حالت سرنگ عمود بر میز کار را در دو نمونه تهیه شده نشان می دهد.

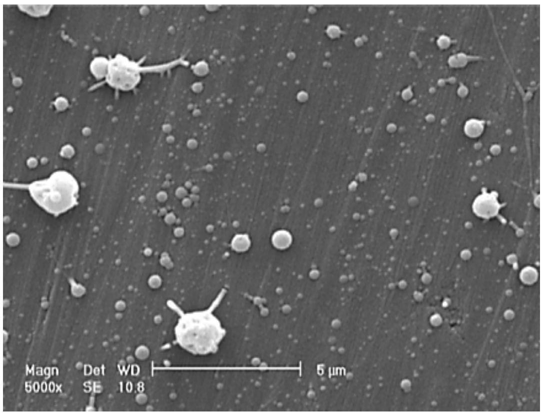
همانطور که در شکل ملاحظه می شود در شرایطی که سرنگ الکترواسپری در وضعیت عمود بر میز کار قرار

دارد، ذرات به صورت کلوخه هایی با ابعاد میکرونی و با توزیعی کاملا غیر یکنواخت ایجاد شده اند. در صورتی که تنها عامل و نیروی کشنده محلول به سمت صفحه جمع کننده حضور میدان الکتریکی و اختلاف پتانسیل ایجا شده توسط منبع ولتاژ بالا در سیستم الکترواسپری باشد، کنترل این پدیده ممکن بوده و می توان به ذراتی با توزیع اندازه مناسب دست یافت. این در حالی است که در شرایط سرنگ عمود بر میز کار علاوه بر نیروی میدان الکتریکی، نیروی جاذبه زمین نیز بر کشش قطره تاثیرگذار است و این عامل منجر به تشکیل کلوخه ها و ذراتی با اندازه غیر قابل کنترل و با توزیع غیریکنواخت می شود. به همین دلیل جهت حذف تاثیر جاذبه زمین بر روی کشش قطره، حالت سرنگ هم راستا با میز کار جهت الکترواسپری محلول کیتوزان انتخاب شد.

شکل (۳) تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی و نمودار توزیع اندازه ذرات مربوط به الکترواسپری محلول کیتوزان در حالت سرنگ هم راستا با میزکار را با اعمال شرایط مختلف جهت دستیابی به حالت بهینه نشان می دهد. شرایط الکترواسپری در حالت (الف) شامل محلول کیتوزان در استیک اسید ۱٪ وزنی– حجمی با نرخ پمپاژ ۰/۱ میلی لیتر بر ساعت و فاصله سر سوزن تا صفحه جمع کننده ۱۰ سانتیمتر بوده و اختلاف پتانسیل اعمال شده ۱۷ کیلوولت است. همانطور که ملاحظه می شود در این شرایط متوسط اندازه ذرات ۱۲۵ نانومتر بدست آمد. شرایط اعمال شده در حالت (ب) تنها تفاوتش با حالت (الف) در اختلاف پتانسیل با اندازه ۱۵ کیلوولت بود که با این تغییر میانگین اندازه ذرات به دست آمده برابر ۹۸/۹ نانومتر می باشد. در حالت (ج) شرایط الکترواسپری شامل محلول کیتوزان درتری فلورو استیک اسید ۲٪ وزنی– حجمی با نرخ پمپاژ ۰/۲۷ میلی لیتر بر ساعت و فاصله سر سوزن تا صفحه جمع کننده ۱۰ سانتیمتر با اختلاف پتانسیل ۱٦ کیلوولت می باشد. همانطور که ملاحظه می شود در این حالت میانگین اندازه ذرات به دست آمده ۱۹۰ نانومتر است. شرایط اعمال شده در حالت (د) نظیر حالت (ج) بوده با این تفاوت که نرخ پمپاژ ۰/۳۳ میلی لیتر بر ساعت و اختلاف پتانسیل اعمالی ١٤ کیلوولت می باشد. میانگین اندازه ذرات به دست آمده در این حالت ۹۱ نانومتر است و بنابراین این شرایط به عنوان شرایط بهینه جهت انجام الکترواسپری محلول کیتوزان انتخاب شد.

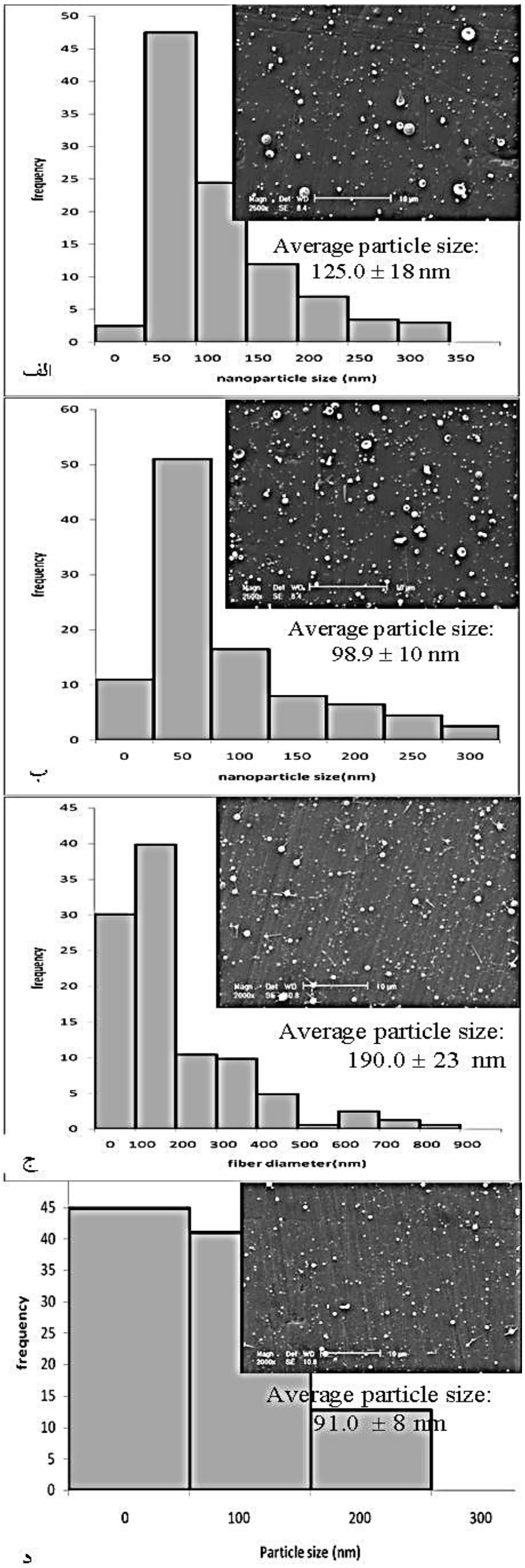


(الف)



(ب)

شکل ۲ ذرات کیتوزان حاصل از الکتراسپری محلول با وضعیت سرنگ عمود بر میز کار در دو نمونه مختلف تهیه شده



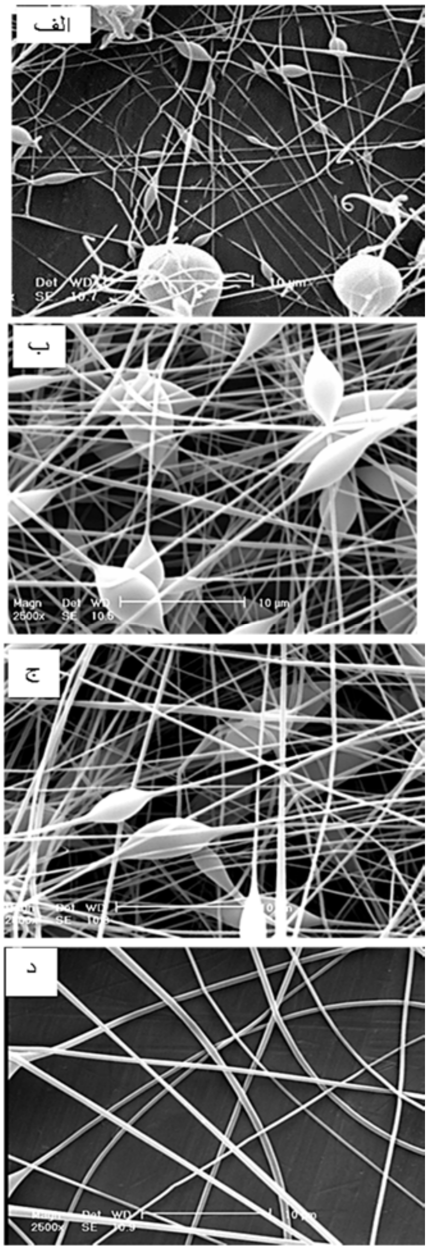
شکل ۳ الکترواسپری با اعمال شرایط ذکر شده در متن (الف)، (ب)، (ج) و (د) در حالت سرنگ هم راستا با میزکار

بررسی مورفولوژی و تعیین میانگین قطر الیاف PLGA خالص

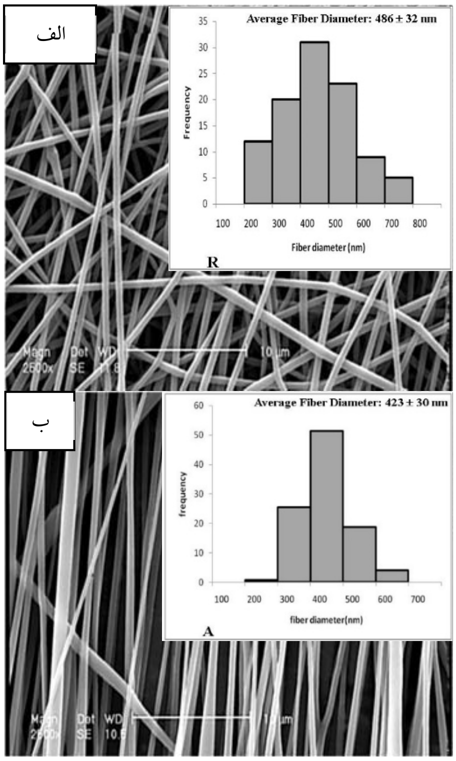
الکتروریسی محلول ۱۰٪ وزنی-حجمی PLGA با تغییر پارامترهای مختلف منجر به تشکیل هیچ ساختاری بر روی صفحه‌ی جمع‌کننده نشد. بنابراین با افزایش غلظت محلول به ۱۵٪ وزنی- حجمی تلاش جهت رسیدن به ساختار مطلوب ادامه یافت. در این غلظت اثر تغییر سایر پارامترها بر مورفولوژی ساختار به‌دست آمده بررسی شد، لیکن با غلظت ۱۵ درصد نیز در هیچ یک از شرایط تهیه‌ی ساختار مطلوب مقدور نشد. شکل (٤) تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی به‌دست آمده از الکتروریسی محلول با اعمال شرایط مختلف و تغییر غلظت محلول جهت رسیدن به شرایط بهینه را نشان می دهد. شکل (٤-الف) الکتروریسی محلول با غلظت ۱۵٪ را نشان می‌دهد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود در شرایط مذکور حضور بیدهای فراوان منجر به عدم دسترسی به ساختار مطلوب می‌شود. شکل این بیدها کروی و بعضا دوکی است و به تعداد فراوان در تصاویر مشاهده می‌شوند. غلظت محلول به ۲۰٪ افزایش یافت و با تغییر پارامترهای مختلف، مورفولوژی ساختار به‌دست آمده بررسی شد. در این غلظت تعداد بیدها کمتر شده و مورفولوژی دوکی شکل پیدا کرده‌اند. با تغییر شرایط در غلظت ۲۰٪، تشکیل الیاف با ساختار مطلوب امکان‌پذیر نشد. شکل (٤-ب) تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی به‌دست آمده از الکتروریسی محلول با غلظت ۲۰٪ را نشان می‌دهد. پس از این‌که با غلظت‌های ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد تهیه‌ی وب نانوالیاف عاری از بید و سایر نواقص میسر نشد، غلظت‌های ۲۲ و ۲۳ درصد نیز با تغییر پارامترهای مختلف بررسی شد. با افزایش غلظت فراوانی بیدها کاهش یافته و کاملا دوکی شکل شده و کشیدگی بید در راستای تشکیل الیاف کاملا قابل شهود می‌شود. شکل‌های (٤-ج) و (٤-د) مورفولوژی PLGA جمع‌آوری شده بر روی صفحه‌ی جمع‌کننده را به‌ترتیب در دو غلظت ۲۲ و ۲۳ درصد نشان می‌دهد.

همان‌طور که ملاحظه می‌شود در غلظت ۲۳ درصد نواقص و بیدهای تشکیل‌شده ضمن الکتروریسی بسیار

کاهش یافته است. روند افزایش غلظت محلول پلیمری به‌خوبی منجر به بهبود مورفولوژی ساختار نانوالیاف شده است.



شکل ٤ تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به الکتروریسی محلول PLGA در غلظتهای (الف) ۱۵٪، (ب) ۲۰٪، (ج) ۲۲٪ و (د) ۲۳٪



شکل ٥ تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی و نمودار میانگین قطر الیاف در حالت: الف) الیاف تصادفی و ب) الیاف هم راستا

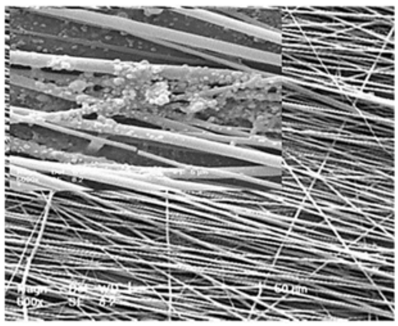
در ادامه تشکیل وب نانوالیاف حاصل از الکتروریسی محلول پلیمری با افزایش غلظت این محلول به ٢٤ درصد ارزیابی شد. نتایج حاصل شده نشان داد غلظت ٢٤ درصد، غلظت بهینه در تهیه‌ی وب نانوالیاف است. وب نانوالیاف حاصل از الکتروریسی محلول ٢٤ درصد ساختاری بدون نقص و بید از خود نشان داد. جهت به‌دست آوردن شرایط بهینه به‌منظور رسیدن به حداقل میانگین قطر الیاف، پارامترهای مختلف به‌جز غلظت تغییر داده شد. در هریک از شرایط مذکور فرایند الکتروریسی در دو حالت انجام شد. با جمع‌آوری الیاف برروی درام پوشیده‌شده با فویل آلومینیوم با سرعت چرخش پایین (٥٠ دور بر دقیقه) الیاف با آرایش نامنظم و تصادفی حاصل شد. در صورتی‌که الیاف با آرایش موازی و هم راستا بر روی درام با سرعت چرخش بالا (٤٠٠٠ دور بر دقیقه) جمع‌آوری شد. به دلیل تعدد تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی حاصل‌شده در شرایط مختلف از الیاف با آرایش نامنظم و تصادفی و الیاف با

آرایش موازی و هم‌راستا تنها این تصاویر در شرایط بهینه تشکیل نانوالیاف در شکل (۵) آمده است که با استفاده از نرم‌افزار Image J ارزیابی شده که نتایج آن به‌صورت نمودار توزیع قطر الیاف در کنار تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوطه آمده است. لازم به‌ذکر است کلیه‌ی آزمایش‌ها حداقل ۳ بار تکرار شده و نتیجه به‌صورت میانگین با انحراف استاندارد گزارش شده است.

میانگین قطر الیاف در شرایط بهینه در آرایش الیاف تصادفی و هم راستا به ترتیب برابر ٤٨٦ و ٤٢٣ نانومتر به دست آمد.

بررسی مورفولوژی و تعیین میانگین قطر الیاف نانوبیوکامپوزیت PLGA/CS

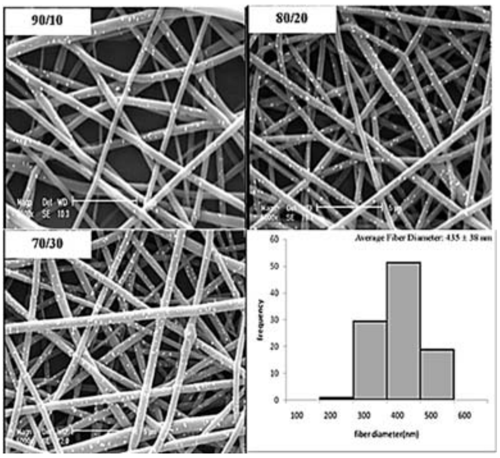
در روش الکتروریسی و الکترواسپری هم‌زمان با استفاده از دو سرنگ عمود برهم جهت تولید داربست نانوبیوکامپوزیتی PLGA/CS، به دلیل تأثیر جاذبه زمین بر روی قطره پلیمری تشکیل شده در نوک سوزن دستیابی به وب نانوبیوکامپوزیت یکنواخت بسیار دشوار است. شکل (٦) مورفولوژی نمونه‌ای از وب نانوبیوکامپوزیت PLGA/CSتهیه شده در شرایط مذکور را نشان می‌دهد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود تجمع موضعی نانوذرات در یک نقطه‌ی خاص و غیریکنواختی و کلوخه‌شدن این ذرات بر روی نانوالیاف PLGA، مورفولوژی غیرمطلوبی را برای کاربردهای مهندسی بافت فراهم کرده است.



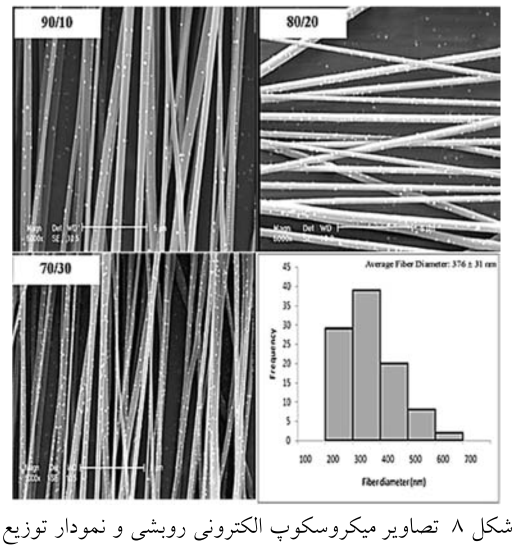
شکل ٦ تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به کامپوزیت PLGA/CS در شرایط الکتروریسی و الکترواسپری عمود برهم در دو بزرگنمایی

نانوبیوکامپوزیت PLGA/CS در شرایط الکتروریسی و الکترواسپری با دو سرنگ مقابل هم به صورت هم راستا انجام شد و در شرایط بهینه داربستها تهیه گردید.

وب نانوبیوکامپوزیت PLGA/CS در سه نسبت ۹۰/۱۰، ۸۰/۲۰ و ۷۰/۳۰ تهیه شد. شکل (۷) تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی و نمودار توزیع قطر الیاف وب به‌دست آمده در نسبت‌های مختلف در آرایش تصادفی و شکل (۸) در آرایش هم راستا را نشان می‌دهد.



شکل ۷ تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی و نمودار توزیع قطر الیاف مربوط به PLGA/CS در شرایط الکتروریسی و الکترواسپری بهینه در حالت آرایش الیاف تصادفی



شکل ۸ تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی و نمودار توزیع قطر الیاف مربوط به PLGA/CS در شرایط الکتروریسی و الکترواسپری بهینه در حالت آرایش الیاف موازی

با تهیه‌ی نانوبیوکامپوزیت PLGA/CS به روش الکترواسپری و الکتروریسی همزمان دو محلول در حالت هم راستا، مشاهده می‌شود که میانگین قطر الیاف در حالت آرایش تصادفی ٤٣٥ نانومتر است. این میانگین قطری در حالت آرایش هم راستا به ٣٧٦ نانومتر می‌رسد.

از آن جا که در این روش، جمع‌آوری نانوالیاف و نانوذرات به‌طور همزمان بر روی درام در حال چرخش انجام می شود بنابراین به‌خوبی با هم مخلوط می شوند. این پراکندگی کاملاً یکنواخت نانوذرات کیتوزان بر روی نانوالیاف PLGA و مورفولوژی یکد ست و یک‌پارچه وب به‌دست آمده در شکل‌های (٧) و (٨) به‌خوبی نشان داده‌شده است.

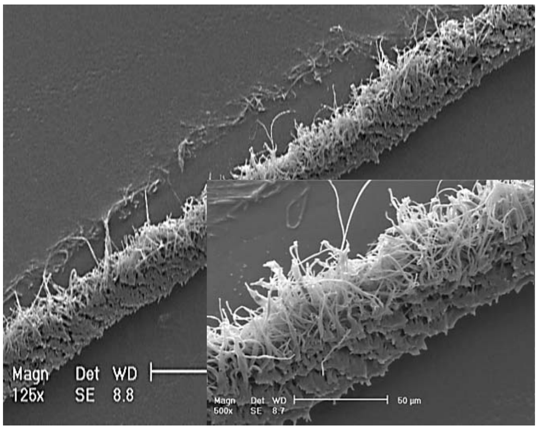
از طرفی همان‌طور که قبلا اشاره شد، میانگین قطر الیاف به‌دست آمده در حالت آرایش هم راستا و موازی کمتر از این میانگین در حالت آرایش نامنظم و تصادفی است چراکه جمع‌آوری الیاف موازی بر روی درام در حال چرخش با سرعت بالا (٤٠٠٠ دور بر دقیقه) صورت می‌گیرد در حالی که برای الیاف تصادفی بر روی درام در حال چرخش با سرعت پایین (٥٠ دور بر دقیقه) صورت می‌گیرد.

تعیین ضخامت وب نانوالیاف

ضخامت مناسب برای وب نانوالیاف در کاربردهای مهندسی بافت در اکثر مقالات برابر ٨٠-٧٠ میکرومتر گزارش شده است. در این پژوهش همه داربست‌ها با همین ضخامت تهیه شد. شکل (٩) تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مقطع عرضی تهیه شده با دستگاه مقطع‌گیر انجمادی را برای یکی از نمونه‌ها نشان می‌دهد.

مطابق با آنالیز تصویر با نرم افزار Image J، ضخامت اندازه گیری شده در محدوده ٧٠ تا ٨٠ نانومتر قرار دارد.

مین و همکاران داربست هایی از جنس PLGA به تنهایی و PLGA همراه با کیتین تهیه کردند [9]. نتایج مربوط به میزان چسبندگی و تکثیر سلول های کراتینوسیت و فیبروبلاست بر روی آن ها نشان داد که حضور جزء کتین در ساختار داربست نقش مهمی در افزایش میزان چسبندگی سلول ها به داربست دارد. هنگ و کیم [10] نیز داربست هایی از جنس کیتوزان و پلی کاپرولاکتون را برای رشد و تکثیر سلول های بنیادی مزانشیمی طراحی کردند که نتایج این ارزیابی حاکی از رشد و چسبندگی بهتر این سلول ها بر روی داربست حاوی جزء کیتوزان در مقایسه با داربست از جنس پلی کاپرولاکتون خالص بود.



شکل ۹ تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مربوط به مقطع عرضی داربست در دو بزرگنمایی

منگ و همکاران داربست هایی از جنس PLGA به تنهایی و PLGA همراه با ژلاتین تهیه کردند [11]. نتایج مربوط به میزان چسبندگی و تکثیر سلول های استئوبلاست بر روی آن ها نشان داد که حضور ژلاتین منجر به افزایش چشمگیری در میزان چسبندگی سلول ها به داربست می شود. همچنین پربکرن و همکاران، رشد و تکثیر و چسبندگی سلو ل های بنیادی مغز استخوان را بر روی داربست هایی از جنس پلی کاپرولاکتون به تنهایی و همراه با کلاژن بررسی کردند که نتایج ارزیابی گویای بهبود رفتار سلولی بر روی داربست حاوی کلاژن بود [12].

بر اساس مطالعات صورت گرفته می توان انتظار داشت که حضور کیتوزان در کنار PLGA در ساختار داربست های تهیه شده در این تحقیق، نقش بسیار کلیدی

در میزان چسبندگی، رشد و تکثیر و در نهایت تمایز سلول های بنیادی به رده های مختلف سلولی در کاربردهای مهندسی بافت ایفا کند.

نتیجه گیری

در این تحقیق از روش همزمانی الکتروریسی محلول PLGA و الکترواسپری محلول کیتوزان در دو حالت سرنگ های عمودبرهم و هم راستا برای ساخت داربست نانوبیوکامپوزیتی PLGA/CS استفاده شد. باتوجه به تاثیرگذاری شدید پارامترهای محیطی و به ویژه جاذبه زمین بر روی کشش قطره سر سرنگ در روش عمود برهم، دستیابی به ساختار یکنواخت و مطلوب داربست نانوبیوکامپوزیتی بسیار دشوار است.

نتایج نشان می دهد ساختاری مناسب و مطلوب برای کاربردهای مهندسی بافت به روش الکتروریسی و الکترواسپری با سرنگ های هم راستا بطور همزمان امکانپذیر است. در شرایط بهینه و با کنترل پارامترهای موثر بر فرآیندهای الکترواسپری و الکتروریسی حصول داربست نانوبیوکامپوزیتی با ساختار و مورفولوژی بسیار مناسب برای کاربردهای مهندسی بافت قابل حصول است.

این یافتهها ما را برآن داشت که این‌گونه داربست را به‌عنوان محصول مهندسی بافت جهت ترمیم بافتهای مختلف معرفی کنیم.

مراجع

1. Liao S., Chan C.K., Ramakrishna S., “Stem cells and biomimetic materials strategies for tissue engineering”, *Materials Science and Engineering C*, Vol. 28, No. 8, pp. 1189-1202, (2008).
2. Shen H., Shen Z.-L., Zhang P.-H., Chen N.-L., Wang Y.-C., Zhang Z.-F., Jin Y.-Q., “Ciliary neurotrophic factor-coated polylactic-polyglycolic acid chitosan”, *Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials,* Vol. 95A, No. 1, pp. 161-170, (2010).
3. Ding F., Wu J., Yang Y., Hu W., Zhu Q., Tang X., Liu J., Gu X., “Use of Tissue-Engineered Nerve Grafts Consisting of a Chitosan/Polylactic-co-glycolic acid-Based Scaffold Included with Bone Marrow Mesenchymal Cells for Bridging 50-mm Dog Sciatic Nerve Gaps”, *Tissue Engineering Part A*, Vol. 16, No. 12, pp. 3779-3790, (2010).
4. Kuo Y.-C., Yeh C.-F., Yang J.-T., “Differentiation of bone marrow stromal cells in poly(lactide-co-glycolide)/chitosan scaffolds”, *Biomaterials*, Vol. 30, pp. 6604–6613, (2009).
5. Xiongjun S., Jianming R., Zhongchi Z., Zhicheng Z., Lesi X., “Evaluation of PLGA/Chitosan/HA Conduits for Nerve Tissue Reconstruction”, *Journal of Wuhan University of Technolotgy-Materials Science Ed.,* Vol. 24, No. 4, pp. 566-570, (2009).
6. Liu C., Xia Z., Czernuszka J.T., “Design and Development of Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering”, *Chemical Engineering Research and Design*, Vol. 85, No. 7, pp. 1051-1064, (2007).
7. Ayres C., Jha B., Sell S., Bowllin G., Simpson D., “Nanotechnology in the design of soft tissue scaffolds: innovation in structure and function”, *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, Vol. 2, pp. 20, (2010).
8. Ellis-Behnke R.G., Liang Y.X., Guo J., Tay D.K.C., Schneider G.E., Teather L.A., Wu W., So K.F., “Forever Young: How to control the Elongation, Differentiation, and Proliferation of Cells Using

Nanotechnology", *Cell Transplantation*, Vol. 18, pp. 1047, (2009).

9. Min B.M., You Y., Kim J.M., Lee S.J., Park W.H., "Formation of nanostructured poly(lactic-co-glycolic acid)/chitin matrix and its cellular response to normal human keratinocytes and fibroblasts", *Carbohydr Polym*, Vol. 57, pp.285–292, (2004).
10. Hong S., Kim G.H., "Fabrication of electrospun polycaprolactone biocomposites reinforced with chitosan for the proliferation of mesenchymal stem cells", *Carbohydr Polym*, Vol. 38, pp. 940-946, (2011).
11. Meng Z.X., Wang Y.S., Ma C., Zheng W., Li L., Zheng Y.F., "Electrospinning of PLGA/gelatin randomly-oriented and aligned nanofibers as potential scaffold in tissue engineering", Materials Science Engineering C, Vol. 30, pp. 1204-1210, (2010).
12. Prabhakaran M.P., Venugopal J.R., Ramakrishna S., "Mesenchymal stem cell differentiation to neuronal cells on electrospun nanofibrous substrates for nerve tissue engineering", *Biomaterials*, Vol. 30, pp. 4996-5003, (2009).